

Cephem 系経口抗生物質 7432-S の免疫学的性質

原田 稔・永田雅史・渡辺 昭・竹内三津男

塩野義製薬株式会社研究所*

新規経口セフェム系抗生物質 7432-S の免疫学的性質をしらべた。

1) モルモットに 7432-S を反復経口投与した場合、及び、7432-S そのものを反復筋肉内注射した場合には、抗体検出方法（能動アナフィラキシー・ショック、同種 PCA 及び ELISA）の如何を問わず、抗体産生をみとめなかった。ただ、7432-S を含む FCA エマルジョン（FCA : Freund's complete adjuvant）をくり返し注射して免疫した動物群のごく少数の個体には、感度の高い ELISA による検定で、強くはないが明瞭な抗体産生が見出された。しかし、FCA エマルジョンを注射する場合、他のセフェム系抗生物質、たとえばセファロシン（cephalothin, CET）やセフメタゾール（cefmetazole, CMZ）、に対しては 7432-S に比べ、より高頻度に明確な抗体産生が認められるという知見からみれば、7432-S に対する抗体産生は低いといえる。なお本実験で、対照薬として用いたセファクロール（cefaclor, CCL）は上記の免疫条件で抗体産生を示さなかった。

2) C57BL/6J マウスに 7432-S、CCL あるいはセフチゾキシム（ceftizoxime, CZX）の FCA エマルジョンを反復した場合、ELISA による検定では、どの薬物も抗体産生を示したが、ラット PCA による検定ではいずれの薬物も IgE 応答を示さなかった。C3H/He マウスを用いた場合も、CZX の FCA エマルジョン注射群の 1 例が IgE 抗体を産生したという点を除き、C57BL/6J マウスと同じ結果が得られた。

3) 7432-S の BGG 結合体（BGG : ウシγグロブリン）で免疫したモルモットに 7432-S をチャレンジした結果、能動アナフィラキシー・ショックはみとめられなかった。また、7432-S-BGG で免疫したモルモットやマウスの抗血清で受動局所感作を成立させておいたモルモットやラットに 7432-S を経口的にあるいは静脈内にチャレンジした場合、PCA は惹起されなかった。このことより、7432-S は過敏症誘発原性を持たないと言える。

4) 各種 β-ラクタム抗生物質の BGG 結合体に対する抗血清を抗体試料とし、各 GpSA 結合体（GpSA : モルモット血清アルブミン）を誘発原とした PCA により、7432-S ハブテンと他の抗生物質ハブテンとの間の免疫学的交差反応性を検定したところ、7432-S ハブテンは CZX ハブテンとの間に交差反応性を示すが、ペニシリン G（penicillin G, PCG）、CET、CMZ、CCL、ラタモキシセフ（latamoxef, LMOX）、ハブテンとの間には交差反応を起こさないことが明らかとなった。しかし、C3H/He マウスの抗血清によるラット PCA においては、7432-S ハブテンは上記の市販抗生物質ハブテンのいずれとも交差反応性を示さなかった。

5) 赤血球膜に対する作用の一つとして、MOLTHAN 法によるヒト赤血球直接クームス反応陽性化作用をしらべ他剤のそれと比較した。CET は 5~10 mg/ml、及び PCG は 40 mg/ml の濃度でクームス反応を陽性化したが、7432-S は 40 mg/ml でも陽性反応を起こさなかった。

以上の結果より、動物における 7432-S の抗原性は市販のセフェム系抗生物質のそれよりも明らかに弱く、ヒトにおいても、本剤がアレルギー性副作用をひき起こす可能性は小さいであろうと推察される。

Key words : 7432-S, 免疫原性, 過敏症誘発原性, 免疫学的交差反応性, クームス反応

β-ラクタム抗生物質が一部の患者において種々のアレルギー性副作用を呈することはよく知られている。従って、新しい β-ラクタム抗生物質を開発する場合、

副作用防止の一助として、その免疫学的性質を動物レベルで実験的にしらべておくことは不可欠である。本報では現在開発が進められている新しい経口セフェム系抗生

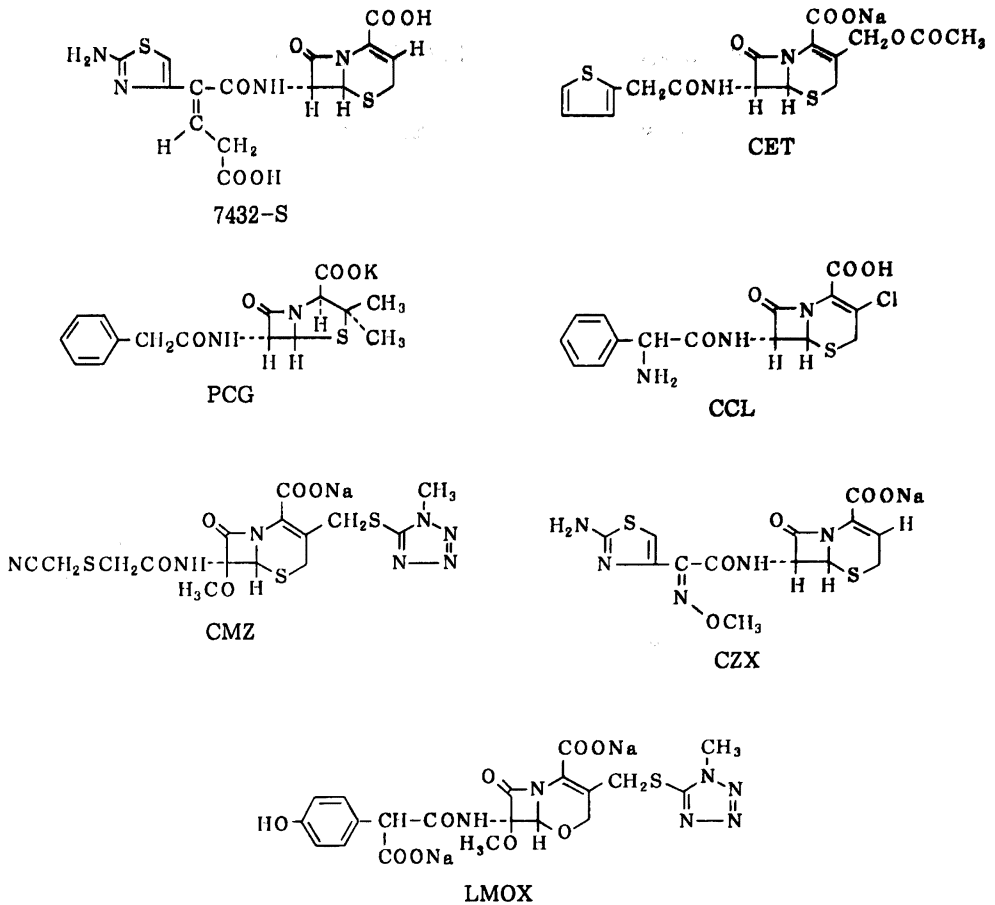


Fig. 1. Chemical structures of test compounds.

物質 7432-S の抗原性、及びヒト赤血球直接クームス反応陽性化作用を市販の抗生物質のそれと比較した。抗原性検定に当り、アレルギー性副作用としては最も重篤なショック、あるいは最も頻度の高い皮疹が含まれる I 型過敏症の発現を中心に実験を行った。

I. 材料及び方法

1. 実験動物

免疫用動物として、モルモット (SPF ハートレー系、雌、250~300 g、日本チャールス・リバー Crj)、及び C3H/He ならびに C57BL/6J マウス (いずれも SPF、雌、6 週令、塩野義製薬油日ラボラトリーズ、Shi) を用いた。PCA レシピエントとしてはモルモット (上記) 及び Wistar/Shi ラット (SPF、雌、7 週令) を使用した。これらの動物は 1~2 週間の予備飼育の後、実験に

供した。

2. 薬物

被験物質として 7432-S (Lot No. 56812、力価 870 $\mu\text{g}/\text{mg}$) を用い、対照物質としてセファクロール (cefaclor, CCL、塩野義、Lot No. 256GK5A)、ペニシリン G (penicillin G, PCG、明治製薬、Lot No. GLD10)、セファロシン (cephalothin, CET、塩野義、Lot No. KF4204)、ラタモキシセフ (latamoxef, LMOX、塩野義、Lot No. KK06)、セフメタゾール (ceftizoxime, CZX、藤沢薬品、Lot No. JA-3210) を用いた。これらの薬物の化学構造を図 1 に示した。

3. 抗生物質と蛋白質との結合体の調製ならびにそのハプテン含量の測定

キャリアー蛋白質としてウシ γ -グロブリン (BGG、

Sigma) 及びモルモット血清アルブミン (GpSA, Sigma) を選び, LEVINE et al.¹¹⁾ に準じて抗生物質の蛋白質結合体を調製した。すなわち, 7432-S 6.0 g (14.6 mmol) を生理食塩水 40 ml に懸濁させ, 氷水浴中冷却下に NaHCO_3 2.71 g (32.3 mmol) を加え, 15 分間攪拌して溶解させる。これに蛋白質溶液 (各 1 g を 40 ml の生理食塩水に溶解したもの) を加え, さらに 20 ml の生理食塩水で蛋白質を洗い込む。得られた混合液を自動滴定装置 (pH Stat, Radiometer 社) にセットし, 外管に 30℃ の温水を循環させながら 1 N NaOH で pH 10 を維持しつつ 72 時間攪拌反応する。その後, 反応液を蒸留水に対して, 4℃ にて 72 時間 (この間に 8.5 ml の外液を 5 回交換する) 透析する。透析後ミリポアフィルターで濾過した後, 凍結乾燥を行った。CCL の蛋白質結合体も同様の方法で調製したが, この場合は pH を 9.2 に保ち, 24 時間の反応を行った。PCG, CET, CMZ 及び LMOX の蛋白質結合の調製も同様の方法によったが, 反応条件の詳細は別報¹²⁾ を参照されたい。

このようにして得られた各種抗生物質の蛋白質結合体のハプテン含有量は EBATA et al.¹³⁾ の方法によって測定した。本報にて使用した蛋白質結合体の組成は下記の通りである。

7432-S ₃₀ -BGG	7432-S ₁₅ -GpSA
CCL ₁₀ -BGG	CCL ₇ GpSA
PCG ₅₅ -BGG	PCG ₃₀ -GpSA
CET ₃₃ -BGG	CET ₂₄ -GpSA
CMZ ₅₈ -BGG	CMZ ₄₅ -GpSA
CZX ₃₄ -BGG	CZX ₂₇ -GpSA
LMOX ₁₉ -BGG	LMOX ₂₈ -GpSA

4. 免疫方法

7432-S は経口剤として開発されることになっているが, 抗原性の検定は本剤を経口投与した場合と非経口投与した場合の双方について実施した。

1) モルモットの免疫

モルモットを 10~20 匹から成る 8 群に分け, それぞれ次のような条件で免疫した。

第 I 群 (10 匹) 200 μ A, 10 秒 ON-10 秒 OFF/3 分間のソニケーションによって均一化した 7432-S の生理食塩水懸濁液 (20 mg/ml) 0.5 ml を, 週 3 回の割合で 2 週間に亘り計 6 回, 経口投与する。

第 II 群 (10 匹) 7432-S の生理食塩水懸濁液 (4 mg/ml) 0.25 ml を, 週 3 回, 2 週間に亘って計 6 回, 大腿部筋肉内に注射する。

第 III 群 (10 匹) 7432-S の生理食塩水懸濁液 (10 mg/

ml) に等量の Freund's complete adjuvant (FCA, Difco) を加えて調製したエマルジョン 0.2 ml を, 週 2 回の割合で 3 週間に亘って計 6 回, 腹腔内に注射する。

第 IV 群 (20 匹) 7432-S-BGG の生理食塩水溶液 (10 mg/ml) に等量の FCA を加えて得たエマルジョン 0.2 ml を 1 週間隔で 3 回, 腹腔内に注射する。

第 V 群 (10 匹) 7432-S と同じくソニケーションによって均一化した CCL の生理食塩水懸濁液 (20 mg/ml) を調製し, 第 I 群と同じ要領で免疫を行う。

第 VI 群 (10 匹) CCL 懸濁液 (4 mg/ml) を調製し, 第 II 群と同じ条件で免疫を行う。

第 VII 群 (10 匹) CCL 懸濁液 (10 mg/ml) に等量の FCA を加えてエマルジョンを調製し, 第 III 群と同様の条件で免疫を行う。

第 VIII 群 (10 匹) CCL-BGG の生理食塩水溶液 (10 mg/ml) と等量の FCA とから成るエマルジョンを調製し, 第 IV 群と同じ条件で免疫を行う。

第 IV 及び VIII の 2 群は最終回免疫の 2 週後に, 他の 6 群は 4 週後に心臓から少量採血し, さらに 2~3 日経過してから能動アナフィラキシー・ショック試験に供した。

なお, 以上の 8 群の他に, 抗 PCG-BGG, 抗 CET-BGG, 抗 CMZ-BGG, 抗 LMOX-BGG ならびに抗 CZX-BGG 血清を得るため 1 群 10 匹の 5 群を設け, 第 IV 及び第 VIII 群と同じ条件下に各 BGG 結合体の FCA エマルジョンで免疫し, 最終回注射の 2 週後に採血を行ない, 群毎に各個体の血清を等量ずつプールした。

2) マウスの免疫

C3H/He 及び C57BL/6J マウスをそれぞれ 10~20 匹から成る 6 群及び 5 群に分け, 次のように免疫した。

i) C3H/He マウス

第 I 群 (10 匹) モルモット第 III 群と同様の要領で, 7432-S を生理食塩水に懸濁させ (10 mg/ml), 等量の FCA を加えてエマルジョンをつくり, 0.2 ml を週 2 回の割合で 3 週間に亘って計 6 回, 腹腔内に注射する。

第 II 群 (10 匹) 7432-S-BGG を生理食塩水に溶かし, 桂¹⁴⁾の方法に従って $\text{Al}(\text{OH})_3$ ゲルに吸着させる。ゲル懸濁液 1 ml に $\text{Al}(\text{OH})_3$ が 5 mg, 7432-S-BGG が 10 μ g 含まれるように濃度調整を行い, 1 匹当たり, 毎回その 0.2 ml を腹腔内に注射する。こうした処置を 1 週間隔で 3 回実施する。

第 III 群 (10 匹) モルモット第 VII 群と同じ要領で CCL を生理食塩水に懸濁させ (10 mg/ml), FCA とのエマルジョンをつくり, 第 I 群と同じ要領で免疫を行う。

第 IV 群 (10 匹) 第 II 群と同様にして CCL-BGG の $\text{Al}(\text{OH})_3$ ゲル吸着物による免疫を行う。

第V群(10匹)第I及び第III群と同様にしてCZXのFCAエマルジョンでの免疫を行う。

第VI群(20匹)第II及び第IV群と同様にCZX-BGGのAl(OH)₃ゲル吸着物による免疫を行う。

第I、第III及び第V群は最終回注射の4週後に、第II、第IV及び第VI群は2週後に心臓から採血し、抗血清を得た。第I～V群の血清は個体別に採取し、個体ごとに抗体産生をしらべたが、抗VI群は免疫学的交差反応性検定に用いることを主たる目的としたために、20匹分の血清をプールし、プールした血清について実験を行った。なお、これらの6群の他に、免疫学的交差反応性の検定に用いる抗PCG-BGG、抗CET-BGG、抗CMZ-BGG、抗LMOX-BGG血清を得るために、4群(1群10匹)を設け、第II群と同じ要領で各抗生物質のBGG結合体のAl(OH)₃吸着物に対する免疫を行い、最終回注射の2週後に抗血清を採りそれぞれプールした。

ii) C57BL/6J マウス

第I群(12匹)C3H/Heマウスの第I群と同じ要領で7432-Sに対して免疫を行う。

第II群(10匹)7432-S-BGGを生理食塩水に溶解し(10 mg/ml)、等量のFCAとともにエマルジョンとし、その0.2 mlを1回腹腔内に注射する。

第III群(10匹)C3H/Heマウスの第III群と同じ要領でCCLに対して免疫を行う。

第IV群(10匹)C57BL/6Jマウスの第II群と同様にしてCCL-BGGのFCAエマルジョンをつくり、1回腹腔内注射を行って免疫する。

第V群(10匹)C3H/Heマウスの第V群と同じく、CZXのFCAエマルジョンを注射して免疫する。

第I、第III及び第V群は最終回注射の4週後に、第II及び第IV群は1回注射8日後に採血した。

5. モルモットの能動アナフィラキシー・ショック試験

上述の諸条件で能動免疫を行った第IV群を除く7群のモルモットのそれぞれ半数の個体には対応する抗生物質10 mgを経口的に投与し、残り半数には対応した多価誘発原(各GpSA結合体)1 mgを静脈内に注射してアナフィラキシー・ショックの発現を観察した。第IV群に関しては、動物を3つの小群に分け、それぞれ7432-Sの経口投与、7432-Sの静脈内、及び7432-S-GpSAの静脈内チャレンジを行った。7432-Sを静脈内に投与するにあたり、7432-Sを生理食塩水に懸濁し、第I群の免疫操作におけると同様、ソニケーションを行い静注可能な微細粒子とした。陰性対照として正常モルモットに各種誘発原をチャレンジし、どの誘発原も非特

異的刺激によるショック症状をひき起こさないことを確認した。アナフィラキシー・ショックの程度を次の4段階に区分した。

軽度：耳の充血、口をもぐつかせ極顔動作を示す、立毛

中等度：チアノーゼ、吃逆発作の反復

重篤：チアノーゼ、強い吃逆発作のため横転死亡

6. モルモット同種PCA(免疫学的交差反応性検定の場合を除く)

正常モルモットの皮内に第I～第V群の各個体の血清を希釈せずに0.05 mlずつ注射し、4時間後、あるいは24時間後にエバンス青5 mgを静注するとともに誘発原をチャレンジしてPCA惹起を試みた。検定は、誘発原として抗血清に対応した抗生物質そのもの10 mgを経口的に(第I～Vの8群の血清の場合)、あるいは静脈内に(第IV群血清にソニケーションにより微細粒子状にした7432-Sの生理食塩水懸濁液を反応させる場合)投与する系と、対応GpSA結合対1 mgを静脈内に投与する系について行なった。各血清に関して、3例ずつのレシピエントを用いたTriplicate testを実施した。チャレンジの60分後に動物を殺し、直径5 mm以上の青色斑が1～3例のレシピエントにて観察される場合をPCA陽性と判定した。

7. マウス抗血清によるラットPCA(免疫学的交差反応性検定の場合を除く)

各免疫群のマウス抗血清を希釈せずに0.05 mlずつWistar/Shiラットの皮内に注射し、24時間後に、対応する抗生物質10 mg(経口的または静脈内)あるいは対応GpSA結合体1 mg(静脈内)をチャレンジした。チャレンジの直前にエバンス青5 mgを静注しておき、チャレンジの1時間後に判定した。ラットのPCAは2例ずつのレシピエントを用いたDuplicate testとし、いずれか一方または双方のレシピエントに直径5 mmまたはそれ以上の青色斑が生じた場合をPCA陽性と判定した。

8. 7432-Sと他のβ-ラクタム抗生物質との間の免疫学的交差反応性

7432-Sの交差反応性をモルモット同種PCA(4時間感作)とマウスIgE抗体によるラットPCAを指標として検定した。すなわち、各抗生物質のBGG結合体を含むFCAエマルジョンで免疫されたモルモットの血清をそれぞれプールし、生理食塩水によってそれらの2倍段階希釈系列をつくる。各抗血清希釈液0.05 mlをモルモットの皮内に注射し、4時間感作の後、誘発原として対応及び非対応のGpSA結合体1 mgをエバンス

青5 mg とともに静注し、PCA 陽性を示す抗血清プールの最高希釈度を比較した。また、C3H/He マウス由来の、各抗生物質の BGG 結合体…Al(OH)₃ゲル吸着物…に対する抗血清プールを用いたラット 24 時間 PCA の場合も同様に検定した。この場合、抗 7432-S-BGG 血清及び抗 CCL-BGG 血清としては、それぞれ第Ⅱ及び第Ⅳ群と同じ条件で新たに免疫した 20 匹の血清をプールしたものを用いた。モルモット PCA では Triplicate test を、ラット PCA では Duplicate test を行った。

9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

抗体の Isotype を問わず、血清の総抗体活性を測定する *in vitro* 試験として ELISA を実施した。Nunc 社の 96 穴マイクロプレートに 7432-S 及び CCL の GpSA 結合体 (2 µg/ml) 0.1 ml を注入し、3～6℃にて一晩放置して抗原吸着を行う。抗原液を吸引除去し、0.05% Tween 20 を含む磷酸緩衝液加生理食塩水 (PBS) を用いて 3 回洗浄したのち、0.05% ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma) を含む PBS で希釈された正常血清または抗血清 0.1 ml を加え、37℃にて 60 分間反応させる。再び 3 回の洗浄によって未反応 γ-グロブリンを除去した後、PBS で 500 倍に希釈したパーオキシダーゼ標識二次抗体 0.1 ml を作用させる。二次抗体としてはヤギ抗モルモット IgG 血清 (H 及び L 鎖特異的, Cappel 社,) 及びヤギ抗マウス (IgA+IgG+IgM) 血清 (Cappel 社,) を使用する。37℃にて 60 分間のインキュベーションを行った後、4 回洗浄し、基質液として 0.08% 5-amino-2-hydroxybenzoic acid (9 容) と 0.05% 過酸化水素水 (1 容) の混合液 0.1 ml を注入する。室温にて 1 時間放置した後、0.1 N 苛性ソーダ 0.1 ml を加えて反応を停止させる。405 nm の吸光度をオートリーダで測定 (Reference 620 nm) する。同様の測定を unconjugated GpSA を吸着させたウェルについても実施する。対応抗生物質の BGG 結合体と抗血清との反応による吸光度から unconjugated GpSA と抗血清希釈液との反応による吸光度を差し引いた値 (即ち、抗生物質ハプテンと抗血清との反応による吸光度) を A、同様に得た抗生物質ハプテンと正常血清希釈液の反応による吸光度を B とし、モルモット抗血清の場合 A が B の 2 倍以上の値を示すものを抗体陽性とした。但し、Nunc 社のマイクロプレートではマウスの正常血清での非特異反応 (B の値) がかなり高く、モルモット抗血清におけるのと同じ判定基準では、希釈度の高い場合には非特異反応が除去されるため問題がないが、希釈度の低い場合には特異反応が非特異反応に遮蔽されてしまう

という事態が起こる場合があったので、マウスの抗血清に関しては判定基準を変更し、 $A > B + 0.1$ の場合を抗体陽性とした。

10. ヒト赤血球直接クームス反応陽性化作用

血液型 O 型及び A 型の健康男子 8 名のヘパリン加血液を使用し、3 つのメーカーのクームス試薬 (ミドリ十字 Lot No. 025, オルソー Lot No. HH851D-A, 東京標準 Lot No. 15-1) を用いて Molthan 法によって 7432-S の直接クームス反応陽性化作用をしらべ、対照薬物 (CET, PCG 及び LMOX) のそれと比較した。術式については既報⁹⁾を参照されたい。なお、クームス試験では、7432-S は水に対する溶解度が低いので、可溶性の Na 塩 (7432-S-Na, 製造 No. F002NN) を用いた。

II. 実験結果

1. モルモットにおける 7432-S の免疫原性及び過敏症誘発原性の検定

1) 能動アナフィラキシー・ショックによる検定

上述の条件で免疫した場合、第Ⅱ及び、第Ⅳ群では免疫中にそれぞれ 1 匹が死亡した (死亡原因不明) が、その他の群では全例が生存した。表 1 に示したように、BGG と結合させた 7432-S で免疫した第Ⅳ群では、7432-S ハプテンに対して能動感作が成立し、多価誘発原 7432-S-GpSA をチャレンジすると全例がショックのために死亡した。しかし、このように感作が成立している動物に 7432-S を経口的に、あるいは静脈内にチャレンジした場合にはショック症状は全くみとめられなかった。この結果から、7432-S 自体は過敏症誘発原性を示さないと言える。一方、7432-S 自体を免疫原として使用するとき、経口免疫を行った場合 (第Ⅰ群) にも、筋注による免疫を行った場合 (第Ⅱ群) にも、さらには 7432-S の FCA エマルジョンの注射を行った場合 (第Ⅲ群) にも感作には成立せず、多価誘発原 7432-S-GpSA チャレンジ後、何らショック症状を観察することはできなかった。この結果から、7432-S 自体はモルモットにおいて組織感作を起こさないと考えられる。対照薬物として使用した CCL に関しては、7432-S と同様、免疫原性も過敏症誘発原性も見出されなかった。なお、陰性対照として正常モルモットにそれぞれの誘発原を経口的にまたは静脈内に投与したが、この場合もショック症状は全くみとめられなかった。

2) 同種 PCA による検定

7432-S および CCL の免疫原性、ならびに過敏症誘発原性の検定は同種 PCA によっても行われた。表 2 に

Table 1. Immunogenicity and shock-eliciting antigenicity of 7432-S and cefaclor in guinea pigs assayed by means of active systemic anaphylaxis

Group	Immunizing condition		Eliciting antigen		Positivity of shock (Positive/Total)
I	7432-S	po	7432-S	po	0/5
			7432-S-GpSA	iv	0/5
II	7432-S	im	7432-S	po	0/5
			7432-S-GpSA	iv	0/4
III	7432-S+FCA	ip	7432-S	po	0/5
			7432-S-GpSA	iv	0/5
IV	7432-S-BGG+FCA	ip	7432-S	po	0/6
			7432-S	iv	0/7
			7432-S-GpSA	iv	7/7(Fatal 7)
V	CCL	po	CCL	po	0/5
			CCL-GpSA	iv	0/5
VI	CCL	im	CCL	po	0/5
			CCL-GpSA	iv	0/5
VII	CCL+FCA	ip	CCL	po	0/5
			CCL-GpSA	iv	0/5
VIII	CCL-BGG+FCA	ip	CCL	po	0/5
			CCL-GpSA	iv	4/4(Fatal 1 Severe 3)

Table 2. Immunogenicity and PCA-eliciting antigenicity of 7432-S and cefaclor in guinea pigs assayed by means of allogeneic PCA

Anitserum tested			Eliciting antigen*)		PCA positivity
Group	Immunizing condition				
I	7432-S	po	7432-S	po	0/10
			7432-S-GpSA	iv	0/10
II	7432-S	im	7432-S	po	0/9
			7432-S-GpSA	iv	0/9
III	7432-S+FCA	ip	7432-S	po	0/10
			7432-S-GpSA	iv	0/10
IV	7432-S-BGG+FCA	ip	7432-S	po	0/20
			7432-S	iv	0/20
			7432-S-GpSA	iv	20/20
V	CCL	po	CCL	po	0/10
			CCL-GpSA	iv	0/10
VI	CCL	im	CCL	po	0/10
			CCL-GpSA	iv	0/10
VII	CCL+FCA	ip	CCL	po	0/10
			CCL-GpSA	iv	0/10
VIII	CCL-BGG+FCA	ip	CCL	po	0/9
			CCL-GpSA	iv	9/9

*) Latent period : 4 hours in case of the combination of anti-antibiotic-BGG sera with homologous GpSA conjugates, and 24 hours in the other cases.

Table 3. Immunogenicity of 7432-S and other cephalosporin antibiotics in guinea pigs assayed by means of ELISA

Antiserum tested			No. of sera tested	No. of sera giving the antibody titer* of					ELISA-positivity
Group	Immunizing condition			<1:10	1:10	1:100	1:1000	≥1:10000	
I	7432-S	po	10	10	0	0	0	0	0/10
II	7432-S	im	9	9	0	0	0	0	0/9
III	7432-S+FCA	ip	10	6	1	1	2	0	4/10
IV	7432-S-BGG+FCA	ip	20	0	0	0	0	20	20/20
V	CCL	po	10	10	0	0	0	0	0/10
VI	CCL	im	10	10	0	0	0	0	0/10
VII	CCL+FCA	ip	10	10	0	0	0	0	0/10
VIII	CCL-BGG+FCA	ip	9	0	0	0	0	9	9/9

*) Antibody titers against homologous GpSA conjugates

Table 4. Immunogenicity in mice and PCA-eliciting antigenicity in rats of 7432-S and other cephalosporin antibiotics assayed by means of rat PCA

Antiserum tested				Eliciting antigen		PCA-Positivity
Group	Immunizing Condition					
C3H/He mice	I	7432-S+FCA	ip	7432-S	po	0/9
				7432-S-GpSA	iv	0/9
	II	7432-S-BGG+Alum	ip	7432-S	po	0/10
				7432-S-GpSA	iv	10/10
	III	CCL+FCA	ip	CCL	po	0/10
				CCL-GpSA	iv	0/10
	IV	CCL-BGG+Alum	ip	CCL	po	0/10
				CCL-GpSA	iv	8/10
	V	CZX+FCA	ip	CZX	iv	0/7
				CZX-GpSA	iv	1/7
	VI	CZX-BGG+Alum *	ip	CZX	iv	0/1
				CZX-GpSA	iv	1/1
C57BL/6J mice	I	7432-S+FCA	ip	7432-S	po	0/11
				7432-S-GpSA	iv	0/11
	II	7432-S-BGG+FCA	ip	7432-S	po	0/10
				7432-S-GpSA	iv	6/10
	III	CCL+FCA	ip	CCL	po	0/10
				CCL-GpSA	iv	0/10
	IV	CCL-BGG+FCA	ip	CCL	po	0/10
				CCL-GpSA	iv	10/10
	V	CZX+FCA	ip	CZX	iv	0/10
				CZX-GpSA	iv	0/10

*) Pooled serum consisted of equal amounts of 10 sera.

示したように、7432-S-BGG や CCL-BGG で免疫された動物の血清にそれぞれ対応した GpSA 結合体を作用させた場合、すべての血清について PCA 陽性を得た。しかし、7432-S および CCL の 2 種類の抗生物質を免疫原とした場合には、免疫方法や誘発原の如何によらず、PCA は陰性であった。

さらに、7432-S-BGG に対する抗血清で感作した動物に 7432-S を経口的に、あるいは 7432-S-Na 塩を静脈内に投与した場合も PCA は惹起されなかった。同様の結果が、抗 CCL-BGG 血清感作動物に CCL 経口チャレンジした場合にも得られた。

このように、PCA による検定結果は能動アナフィラキシーでの結果と一致し、7432-S および CCL には免疫原性も PCA 誘発原性もみとめられなかった。

3) ELISA による免疫原性の検定

アナフィラキシー性の抗体のみならず、IgM や IgA あるいは IgG₂ 等の非アナフィラキシー性抗体をも含めた、血清中の総抗体活性を ELISA によって検定した(表 3)。

7432-S-BGG あるいは CCL-BGG に対する抗血清は、いずれも 1 : 10,000 以上の高い抗体価を示した。7432-S の FCA エマルジョンで免疫した第Ⅲ群では、10 例中 2 例が 1 : 1,000、1 例が 1 : 100、もう 1 例が 1 : 10 の抗体価を示したが、アジュバントを使用せず、7432-S のみを経口的にあるいは筋肉内に反復投与した場合(第Ⅰ及び第Ⅱ群)には抗体活性を示す血清は見出されなかった。対照薬 CCL に関して、アジュバントの存在下、非存在下を問わず抗体産生は全くみとめられなかった。

2. マウスにおける免疫原性及びラットにおける過敏症誘発原性の検定

C3H/He 及び C57BL/6J マウスにおける 7432-S の免疫原性をラット PCA (IgE 応答能の検定) と ELISA (IgA+IgG+IgM 抗体産生の検定) とでしらべ、対照薬 CCL 及び CZX のそれと比較した。免疫期間中に C57BL/6J マウスでは第Ⅰ群の 1 匹が、また、C3H/He マウスでは第Ⅰ群の 1 匹および第Ⅴ群の 3 匹が死亡した。死亡原因は不明であるが、FCA エマルジョンの反復注射に基づく毒性死であろうと推察される。

1) ラット PCA による検定

上記 3 種のセフェム系抗生物質の BGG 結合体を Al(OH)₃ ゲル (C3H/He マウスの場合)、または FCA (C57BL/6J マウスの場合) とともに注射した動物群では、それぞれのハプテンに対する IgE 抗体が対応 GpSA をチャレンジすることによって高率に検出され

た(表 4)。しかし、各抗生物質を含む FCA エマルジョンの反復注射を行った動物群では、CZX 免疫の C3H/He マウス(第Ⅴ群)の 1 例に検出された以外、IgE 抗体の産生をみとめることはできなかった。

また、多価誘発原をチャレンジした場合にラット PCA を起こし得る各薬物-BGG 結合体に対する抗血清に、それぞれ対応する薬物を誘発原として反応させた場合、PCA は全く起こらなかった。このことから、上記 3 種類の抗生物質はラットにおいて PCA 誘発原性を持たないことが明らかにされた。

2) ELISA による検定

IgE 抗体のみを分別定量するラット PCA と異なり、Isotype の如何に拘わりなく抗体を検出し得る ELISA では、7432-S、CCL 及び CZX のいずれの抗生物質に対しても、FCA とともに注射した場合には、両系統のマウスの全個体に抗体産生がみとめられた(表 5)。抗体価から判断して、この条件下におけるこれら 3 種の抗生物質の免疫原性は互いに近似していると判断される。

3. 7432-S ハプテンと他の β-ラクタム抗生物質ハプテンとの間の免疫学的交差反応性

モルモットにおける同種 PCA ならびにラットにおける PCA (マウス IgE 抗体による) によって 7432-S と他の β-ラクタム抗生物質との間の免疫学的交差反応性を検定した。

1) モルモット同種 PCA による検定

抗体試料として表 6 に示した各種 BGG 結合体に対する抗血清プールを用い、誘発原として対応及び非対応 GpSA 結合体をチャレンジした場合の抗血清の PCA 抗体価を検定した。表 6 に示したように、7432-S ハプテンと CZX ハプテンとの間に交差反応性がみられた。すなわち、抗 7432-S-BGG 血清と CZX-GpSA との組合せ、及び、抗 CZX-BGG 血清と 7432-S-GpSA との組み合わせで PCA が観察された。どちらの抗血清プールも、GpSA をチャレンジした場合には PCA を起こさなかった。但し、7432-S と CZX 両ハプテン間の交差反応性は、抗血清の交差抗体価からみてそれほど強力なものとは考えられない。7432-S と他の 5 種類の β-ラクタム抗生物質ハプテンとのあいだには交差反応をみとめることはできなかった。

2) マウス IgE 抗体によるラット PCA での検定

Al(OH)₃ ゲルに吸着した各種 BGG 結合体に対する C3H/He マウスの抗血清プールを用い、ラット PCA で検定した結果を表 7 に示した。7432-S ハプテンは CCL、CMZ、CET、PCG 及び LMOX のどのハプテンとの間にも交差反応性を示さなかったのみならず、モル

Table 5. Immunogenicity of 7432-S and other cephalosporin antibiotics in mice assayed by means of ELISA

Antiserum tested			No. of sera tested	No. of sera giving the antibody titer* of					ELISA-positivity
Group	Immunizing condition			<1:10	1:10	1:100	1:1000	≥1:10000	
C3H/He mice	I	7432-S+FCA ip	9	0	0	0	6	3	9/9
	II	7432-S-BGG+Alum ip	10	0	0	0	2	8	10/10
	III	CCL+FCA ip	10	0	0	0	5	5	10/10
	IV	CCI-BGG+Alum ip	10	0	0	0	4	6	10/10
	V	CZX+FCA ip	7	0	0	0	1	6	7/7
	VI	CZX-BGG+Alum ip	1**	0	0	0	0	1	1/1
C57BL/6J mice	I	7432-S+FCA ip	11	0	0	0	7	4	11/11
	II	7432-S-BGG+FCA ip	10	0	0	0	2	8	10/10
	III	CCL+FCA ip	10	0	1	7	2	0	10/10
	IV	CCL-BGG+FCA ip	10	0	0	0	1	9	10/10
	V	CZX+FCA ip	10	0	0	1	7	2	10/10

*) Antibody titers against homologous GpSA conjugates.

**) Pooled serum consisted of equal amounts of 10 sera of a group.

Table 6. Immunological cross-reactivity of 7432-S hapten with other β -lactam antibiotic haptens assayed by means of allogeneic 4-h PCA in guinea pigs

Antiserum	Eliciting antigen	PCA titer
Anti-7432-S-BGG	7432-S-GpSA	2 ¹¹
	CCL-GpSA	Negative
	CZX-GpSA	2 ²
	PCG-GpSA	Negative
	CET-GpSA	Negative
	CMZ-GpSA	Negative
	LMOX-GpSA	Negative
Anti-CCL-BGG	CCL-GpSA	2 ¹¹
	7432-S-GpSA	Negative
Anti-CZX-BGG	CZX-GpSA	2 ¹²
	7432-S-GpSA	2 ⁸
Anti-PCG-BGG	PCG-GpSA	2 ¹²
	7432-S-GpSA	Negative
Anti-CET-BGG	CET-GpSA	2 ¹³
	7432-S-GpSA	Negative
Anti-CMZ-BGG	CMZ-GpSA	2 ¹³
	7432-S-GpSA	Negative
Anti-LMOX-BGG	LMOX-GpSA	2 ¹¹
	7432-S-GpSA	Negative

Table 7. Immunological cross-reactivity of 7432-S hapten with other β -lactam antibiotic haptens assayed by means of rat PCA mediated by mouse IgE antibodies

Antiserum	Eliciting antigen*	PCA titer
Anti-7432-S-BGG	7432-S-GpSA	2 ⁷
	CCL-GpSA	Negative
	CZX-GpSA	Negative
	PCG-GpSA	Negative
	CET-GpSA	Negative
	CMZ-GpSA	Negative
	LMOX-GpSA	Negative
Anti-CCL-BGG	CCL-GpSA	2 ⁴
	7432-S-GpSA	Negative
Anti-CZX-BGG	CZX-GpSA	2 ⁹
	7432-S-GpSA	Negative
Anti-PCG-BGG	PCG-GpSA	2 ¹⁰
	7432-S-GpSA	Negative
Anti-CET-BGG	CET-GpSA	2 ⁸
	7432-S-GpSA	Negative
Anti-CMZ-BGG	CMZ-GpSA	2 ¹⁰
	7432-S-GpSA	Negative
Anti-LMOX-BGG	LMOX-GpSA	2 ⁷
	7432-S-GpSA	Negative

*) 1 mg/animal

モット同種 PCA での検定結果と異なり, CZX ハプテンとの間にも交差反応性を示さなかった。CMZ ハプテンとの間には痕跡的に色素漏出がみとめられる場合があったが, 明確な陽性とは言えなかった。

4. ヒト赤血球直接クームス反応陽性化作用

MOLTIAN 法による赤血球直接クームス反応陽性化作用を表 8 に示した。対照薬として用いた CET は終濃度 2.5~10 mg/ml にて, PCG は 20~40 mg/ml にて陽性反応を呈したが, 7432-S は 40 mg/ml の高濃度においても陽性反応を起こさなかった。

Ⅲ. 考 察

上述のように, モルモットにおいて 7432-S を単独で経口的あるいは非経口的に投与した場合は抗体産生を示さなかった。ただ, FCA とのエマルジョンとして投与した場合には, 極めて鋭敏な ELISA によれば少数例にて若干の抗体活性が示された。本実験において対照薬として用いた CCL は免疫条件や検定方法の如何を問わ

ず免疫原性を全く示さなかった。しかし, すでに報告したように, 同じ条件下にて他のセフェム系薬物にはより強い免疫原性が観察されている²⁾。たとえば, CET は FCA とともに投与した場合に, また, CMZ は FCA の有無に関係なく, かなりの高頻度を以てショックのための能動感作や血清 IgG₁ PCA 抗体産生をひき起こした。したがって, モルモットにおいて, 7432-S の免疫原性は CET や CMZ 等の市販セフェム系抗生物質のそれに比べれば明らかに弱いと判断される。7432-S を含むエマルジョンをマウスに注射した場合, C3H/He 及び C57BL/6J のいずれの系統においても, IgE 抗体の産生はみとめられなかったが, ELISA による総抗体活性 (IgA+IgG+IgM) の検定では, 両系統のマウスの全例に顕著な抗体産生がみとめられた。但し, 同程度の抗体産生が CCL や CZX の FCA エマルジョンによる免疫群にも観察されたので, この条件での抗体産生は 7432-S に限った現象ではないと言える。CET の FCA エマルジョンで免疫した場合は C57BL/6J マウ

Table 8. *In vitro* direct Coombs' reaction of human red blood cells

Red cells (Blood group type)	Coombs' reagent**	Minimal concentration(mg/ml) giving positive reaction				
		7432-S	CET	PCG	LMOX	CMZ
H.F* (Type O)	A	>40	10	>40	>40	>40
	B	>40	5	40	>40	>40
	C	>40	5	40	>40	>40
T.S (Type O)	A	>40	10	>40	>40	>40
	B	>40	5	40	>40	>40
	C	>40	10	40	>40	>40
M.T (Type O)	A	>40	10	>40	>40	>40
	B	>40	5	40	>40	>40
	C	>40	5	40	>40	>40
M.H (Type A)	A	>40	10	>40	>40	>40
	B	>40	2.5	40	40	40
	C	>40	10	40	>40	>40
M.M (Type A)	A	>40	10	>40	>40	>40
	B	>40	5	20	>40	>40
	C	>40	10	40	>40	>40
A.W (Type A)	A	>40	10	>40	>40	>40
	B	>40	5	40	>40	>40
	C	>40	10	40	>40	>40

*) Initials of volunteers

**) Manufacturer A : Midori Juji

B : Ortho

C : Tokyo Hyojun Kessei

スにて、CMZ の FCA エマルジョンで免疫した場合は C3H/He マウスにて、ELISA 陽性抗体のみでなく、IgE 抗体の産生が高率に観察されること⁹⁾と比較すると、マウスにおいても 7432-S の免疫原性はこれら 2 種類の市販セフェム系抗生物質のそれに比べて弱いと判断される。7432-S の FCA エマルジョンで免疫して得た抗血清の抗体活性を ELISA で検定した場合、マウス抗血清では明らかな陽性（抗体価 1,000~10,000 倍）を観察することができたのに対し、モルモットでは 10 例中 2 例にわずかな抗体産生（抗体価 100 倍）がみられたに過ぎなかった。材料と方法の項に記したように、モルモット血清についての ELISA 陽性の判定基準がマウス血清についてのそれと異なっているが、このことがこうした結果の差をもたらしたのではないかと疑問が生じる。判定基準を違えたのは、Nunc 社のプレートへのマウス γ -グロブリンの非特異的吸着が強く、血清希釈度

の低い場合、正常血清によっても酵素反応が強く起こるため判定が不能になったからである。1,000~10,000 倍という高希釈度においてはマウス正常血清による非特異反応は著しく弱くなり、これらの希釈倍数では、モルモット血清と同じ判定基準に従っても、明らかな抗体活性を読み取ることができた。従って、モルモット抗血清とマウス抗血清との間にみられた結果の相違は、判定基準の差に基づくものではなく、これら 2 種の動物における抗体産生の差によるものであろう。

7432-S は PCG, CET, CMZ, CCL 及び LMOX との間に免疫学的交差反応性を示さなかった。このことはモルモット PCA においてもラット PCA においても観察された。ただ、CZX との間の交差反応性はモルモット PCA においては明らかであった（程度の上で強くはない）が、ラット PCA では全くみとめられなかった。我々は、さきに Benzylpenicilloyl (BPO) ハプテンと

CET ハブテンの間の交差反応性が、テストに用いる抗 BPO 抗体試料如何によって一定しないことを報告した¹⁾が、本報告における差異もそれに類した現象であろうと考えられる。

以上のように、7432-S は免疫原性においても過敏症誘発原性においても、他のセフェム系抗生物質と比べて特筆すべき問題を示さなかったし、市販の β -ラクタム抗生物質との免疫学的交差反応性も、7 位側鎖が類似している CZX との間に若干みとめられたのみであり、問題視するには及ばなかった。さらに、*in vitro* 直接クームス反応陽性化作用もみとめられなかった。これらの非臨床試験結果を総括して、臨床使用に際しても、7432-S が市販の抗生物質に比べてアレルギー性副作用を多発するとは考え難い。

(実施期間：1985 年 11 月～1986 年 11 月)

謝 辞

本研究を施行するに際し、7432-S、CCL ならびに CZX と蛋白質との結合体の調製、及び、使用したすべての蛋白質結合体のハブテン結合数測定を塩野義製薬研究所 井上 健博士、ならびに伊賀野憲一氏にお願いした。ここに深甚の謝意を表したい。

文 献

- 1) LEVIN, B. B. and OVARY, Z : Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N-(D- α -benzyl-penicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for the hypersensitivity to penicillin G. J. Exp. Med. 114 : 875~904, 1961
- 2) 原田 稔, 永田雅史, 渡辺 昭, 竹内三津男 : 6315-S ならびにその代謝物 6315-S oxide の免疫学的性質, Chemotherapy 35 (S-1) : 435~451, 1987
- 3) EBATA, M., MIYAKE, Y and UCHIDA, J. : A quantitative assay of covalently bound cephalosporin derivatives in cephalosporin-protein conjugates. J. Antibiotics 29 : 665~666, 1976
- 4) 桂 義元 : アジュバントの種類と適用, 免疫実験操作法 A, 日本免疫学会編, pp. 49~52, 1976
- 5) 原田 稔, 竹内三津男 : Cefamandole の *in vitro* クームス反応陽性化作用, Chemotherapy 27 (S-5) : 635~639, 1979
- 6) HARADA, M., WATANABE, A., MATSUMOTO, M. and TAKEUCHI, M. : Induction of IgG₁ and IgE responses to protein-conjugated and unconjugated β -lactam antibiotics in the mouse—efficacy of Freund's complete adjuvant. Experientia 41 : 1584~1595, 1985
- 7) HARADA, M., WATAMABE, A. and MATSUMOTO, M. : Heterogeneity of cross-reactivity of mouse anti-benzylpenicilloyl antibodies against cephalothin haptens or polymers. Japan. J. Pharmacol. 40 : 182~184, 1986

IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF 7432-S, A NEW CEPHALOSPORIN ANTIBIOTIC AGENT FOR ORAL USE

MINORU HARADA, MASAFUMI NAGATA, AKIRA WATANABE
and MITSUO TAKEUCHI

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.
5-12-4, Sagisu, Fukushima-ku, Osaka 553, Japan

The immunological properties of 7432-S, a newly developed cephalosporin antibiotic agent for oral use, were examined in reference to cefaclor (CCL).

1) Immunogenicity in guinea pigs : No antibody response to 7432-S was shown by active systemic anaphylaxis, 24-h passive cutaneous anaphylaxis (PCA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), when guinea pigs were immunized with multiple oral or intramuscular administrations of unconjugated 7432-S. However, weak but definite antibody production was detected by the most sensitive assay, ELISA, in a few animals which had been immunized with repeated intraperitoneal injections of 7432-S emulsified with Freund's complete adjuvant (FCA). Under the same immunizing conditions, CCL did not produce antibodies. However, making reference to our previous finding that cefalothin (CET) and cefmetazole (CMZ) induced much more potent immune responses under the same conditions, 7432-S is less immunogenic than these commercial antibiotic preparations.

2) Immunogenicity in mice : When C57BL/6J mice were injected with FCA emulsion containing 7432-S, CCL, or ceftizoxime (CZX), antibody response was detected to each antibiotic agent by means of ELISA but not by rat PCA. Similar results were obtained in C3H/He mice which had been immunized to 7432-S, CCL or CZX with the exception of production of anti-CZX IgE antibody in only one animal.

3) Hypersensitivity-eliciting antigenicity : Oral and intravenous challenge with unconjugated 7432-S to guinea pigs presensitized actively with 7432-S-BGG (BGG : bovine γ -globulin) conjugate did not elicit systemic anaphylaxis. Similarly, challenge with plain 7432-S did not provoke PCA in guinea pigs which had been locally sensitized with anti-7432-S-BGG serum. Also, 7432-S as well as CCL and CZX did not elicit PCA in rats which had been sensitized passively with mouse antiserum to the homologous antibiotic-BGG conjugate. These results indicate that 7432-S does not have hypersensitivity-eliciting antigenicity.

4) Immunological cross-reactivity of 7432-S hapten with other β -lactam antibiotic haptens : Immunological cross reactivity of 7432-S with six other β -lactam antibiotics, i.e. CCL, CZX, penicillin G (PCG), CET, CMZ and latamoxef (LMOX), was examined by means of 4-h PCA in guinea pigs and 24-h PCA in rats mediated by guinea pig IgG₁ and mouse IgE antibodies, respectively. Antisera to antibiotic-BGG conjugates were used as the antibody preparations and antibiotic-GpSA (GpSA : guinea pig serum albumin) conjugates were employed as elicitors. In guinea pig PCA, 7432-S hapten cross-reacted with CZX hapten but not at all with the other antibiotic haptens. In rat PCA, however, no cross reactivity was observed between 7432-S and other haptens.

5) Activity to produce *in vitro* direct Coombs' reaction : The activity of 7432-S to produce direct Coombs' reaction was compared with those of CET, CMZ, PCG and LMOX using human red blood cells. CET and PCG produced a positive reactions at the final concentrations of 2.5 to 10 mg/ml and 20 to 40 mg/ml, respectively. However, 7432-S as well as CMZ and LMOX did not cause a positive reaction even at 40 mg/ml.